Weitere tierexperimentelle Studien über die Bildung humoraler Antikörper gegen homo- und autologes Lebergewebe

Fluoreszenzserologische Befunde

von

Heinz Rotsch

aus Aussig (CSR)

1966

1967 № 64

AUS DER ABTEILUNG FÜR KLINISCHE IMMUNOLOGIE DES UNIVERSITÄTSKRANKENHAUSES

ERLANGEN-NÜRNBERG

Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

WEITERE TIEREXPERIMENTELLE STUDIEN ÜBER DIE BILDUNG HUMORALER ANTIKÖRPER GEGEN HOMO- UND AUTOLOGES LEBERGEWEBE

Fluoreszenzserologische Befunde

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT

zu

ERLANGEN-NÜRNBERG

vorgelegt von

Heinz Rotsch

aus Aussig (CSR)

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. K.G. OBER
Referent: Professor Dr. F. SCHEIFFARTH

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 1966

Für die Pathogenese der chronischen Hepatitis sind in den vergangenen Jahren immer wieder Autoimmunisierungsprozesse verantwortlich gemacht worden. Die Annahme eines solchen Pathomechanismus gründete sich einerseits auf die autonome Prozeßhaftigkeit, die das klinische Bild dieser Krankheit auszeichnet, andererseits auf dem Nachweis von zirkulierenden Antikörpern, die bei einer großen Zahl von Leberkranken gefunden werden, die in der Mehrzahl gegen zytoplasmatische Antigene der Leberzelle gerichtet sind, aber auch antinukleäre Antikörper umfassen (2, 3, 1o, 11).

Um beweisen zu können, daß der chronischen Hepatitis ein Autoimmunisierungsprozeß zugrunde liegt, wurde in den letzten Jahren mit wechselhaftem Erfolg versucht, dem pathologisch-anatomischen Bild der chronischen Hepatitis entsprechende Veränderungen im Tierexperiment durch Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt zu erzielen (1, 15).

Frühere tierexperimentelle Versuche haben gezeigt, daß bei nicht vorgeschädigter Leber die Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt allenfalls zu einer Isoantikörperbildung führt und offensichtlich keine schwerwiegenden Läsionen an der Leber setzt (1, 1o). Anatomische Leberveränderungen wurden bislang nur beobachtet, wenn bei den Sensibilisierungsverfahren homologes Leberantigen, emulgiert in FREUND'schem Adjuvans, verwendet wurde (4, 11, 12).

In der vorliegenden Versuchsreihe an Kaninchen sollte geklärt werden, ob es gelingt, nach Vorbehandlung mit lebertoxischen Stoffen, hier mit Tetrachlorkohlenstoff und anschließender Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt und FREUND'schem Adjuvans, einen schwerwiegenden Leberparenchymschaden zu erzeugen, der die morphologischen Kriterien der chronischen Hepatitis erzeugt.

METHODIK

I. Tiermaterial und Versuchsanordnung

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 10 Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 2500 g vorgenommen.

Nach Entnahme einer ersten Blutprobe wurde diesen Tieren eine Emulsion von 10%igem Äthyl-Alkohol und Tetrachlorkohlenstoff im Verhältnis 5 : 1 über eine Nährsonde transduodenal appliziert. Um die Nährsonde legen zu können, wurden die Tiere mit Evipan i.v. narkotisiert. Im einzelnen erhielt dann jedes Tier 5 ml dieser Emulsion. 5 der so behandelten Tiere wurden als Kontrollen belassen, während die restlichen Tiere nach 8 Wochen mit homologem Leberextrakt unter Verwendung von FREUND'schem Adjuvans nach folgendem Schema (Abb.: 1) sensibilisiert wurden.

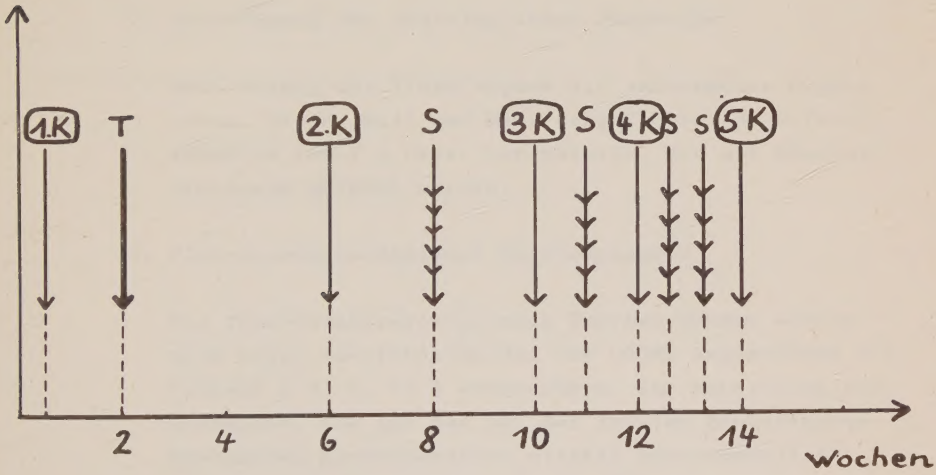

Abb.: 1 Sensibilisierungsschema

K = Kontrolle (Blutentnahme)
T = transduodenale Applikation von Tetrachlorkohlenstoff
S = Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt und FREUND'schem Adjuvans

Nach Abschluß der Sensibilisierung wurden alle Tiere getötet und Organteile von Leber, Niere, Herz und Milz entnommen. Nach makroskopischer Inspektion und Beurteilung der Organe wurden diese eingefroren. Als Gefrierschnitte wurden sie anschließend histologisch und fluoreszenzserologisch untersucht.

II. Methoden

1. Aufbereitung des homologen Leberextraktes

Hierzu wurde die Leber eines gesunden Kaninchens entblutet und die Gefäße mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült. Danach wurde die Leber zerkleinert und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Der Leberextrakt wurde mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und anschließend mit 1o ooo U/min 2o min lang bei + 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Sensibilisierung der Kaninchen verwendet und zwar wurde der Leberextrakt mit FREUND'schem Adjuvans im Verhältnis 2 : 1 gemischt. Die Emulsion wurde i.m. nach dem oben angegebenen Sensibilisierungsschema injiziert.

2. Anfertigung der histologischen Präparate

Nach Tötung der Tiere wurden die entnommenen Organe Leber, Niere, Milz und Herz eingefroren und Gefrierschnitte von 7 µ Dicke hergestellt, die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden.

3. Fluoreszenzserologische Untersuchungen

Die fluoreszenzserologischen Untersuchungen wurden nach einer Modifikation des von COONS angegebenen Verfahrens (5, 6, 11) vorgenommen. Zur Markierung der Globuline, die aus den bei der letzten Blutentnahme gewonnenen Kaninchenseren mittels Ammoniumsulfatfällung abgetrennt waren, wurde Fluoreszeinisothiozyanat in einer Dosierung von o,o1 mg/mg Eiweiß verwendet. Die Reinigung der markierten Seren erfolgte einerseits durch Dialyse gegen gepufferte physiologische Kochsalzlösung, andererseits durch Behandlung der

Seren, durch Trennung an der DEAE - Zellulosesäule (11). Von den eingefrorenen Leberstückchen wurden Gefrierschnitte von 7 µ Dicke hergestellt und diese vor der Inkubierung mit den markierten autologen Seren (3o min) bei 37°C im Brutschrank in Methanol fixiert und anschließend 3o min in physiologischer Kochsalzlösung gewässert. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Im einzelnen wurden die Präparate nach Fluoreszenzbefund der Parenchymzellen, d.h. des Zytoplasmas und der Zellkerne, sowie der Gallengangsepithelien ausgewertet.

In Kontrollversuchen wurden ungefärbte Präparate auf Spontanfluoreszenz untersucht. Weiterhin wurde an Stelle der Seren von den sensibilisierten Tieren ein Normalserum verwendet. Es wurden ferner Nieren-, Herz- und Milzschnittpräparate mit den markierten Seren inkubiert, um die Organspezifität etwa gefundener Antikörper nachzuweisen.

III. Ergebnisse

1. Beobachtungen an den Tieren während der Behandlungsdauer

Mit Ausnahme von 3 Tieren, die während des Versuches an einer Perforation des Ösophagus durch die Sonde starben, vertrugen die Kaninchen den intraduodenal applizierten Tetrachlorkohlenstoff gut, d.h. sie setzten lediglich ca. 1 Tag mit der Futteraufnahme aus. Die nachfolgende Sensibilisierung mit Leberextrakt und FREUND'schem Adjuvans, sowie die Blutentnahmen vertrugen sie zunächst ebenfalls gut, insbesondere trat keine Beeinträchtigung des Wohlbefindens ein. Im Laufe der Sensibilisierung magerten die Tiere allerdings ab.

2. Pathologie der Tierorgane

a) Makroskopie

Die makroskopische Untersuchung der einzelnen Organe Leber, Milz, Nieren, Herz, zeigte bei den 5 Tieren, die 7 Monate vor Tötung Tetrachlorkohlenstoff intraduodenal appliziert bekamen, keine Veränderungen, die auf pathologische Vorgänge schließen ließen.

Im Gegensatz dazu war bei der Gruppe der zusätzlich sensibilisierten Kaninchen die Leberoberfläche gelblich verfärbt und ihre Konsistenz vermehrt. Weiterhin war die indurierte und vergrößerte Milz auffällig. Herz und Nieren waren auch bei dieser Gruppe ohne Veränderungen.

b) Histologische Befunde nach Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Bei den 5 lediglich mit Tetrachlorkohlenstoff transduodenal vergifteten Kaninchen zeigten sich am Leberparenchym nur geringe Veränderungen, so eine trübe Schwellung der Parenchymzellen und eine mäßige Zellinfiltration im Bereich der periportalen Felder, insgesamt jedoch mit Bezug auf die Leberzellen selbst, keine Zeichen von Leberveränderungen im Sinne der chronischen Hepatitis. Herz, Nieren und Milz zeigten keine morphologischen Veränderungen.

Bei den zusätzlich sensibilisierten Kaninchen waren die trübe Schwellung und insbesondere die Infiltration der periportalen Felder mit mononukleären Zellen und die Vermehrung der KUPFFER'schen Sternzellen stärker ausgeprägt. Für die Entwicklung etwa bindegewebiger Proliferationen im Sinne einer Zirrhose oder Gallengangssprossungen bestand jedoch kein Anhaltspunkt. Die Nieren zeigten im Bereich der Tubuli ebenfalls das Bild der trüben Schwellung. Herz und Milz wiesen keine Veränderungen auf.

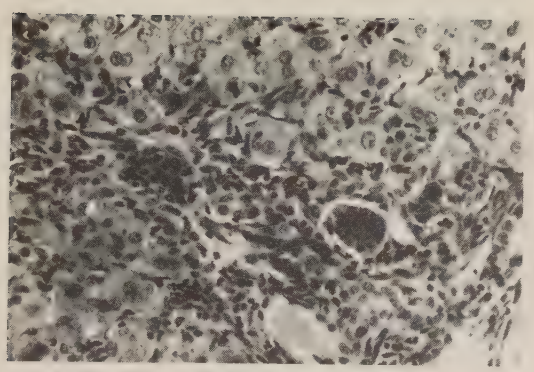

Abb.: 2 Histologischer Befund der Leber eines mit homologem Leberextrakt sensibilisierten Kaninchens. Man erkennt deutlich die Infiltration von mononukleären Zellen, sowie die Anreicherung von KUPFFER'schen Sternzellen periportal.

Tier	Serum	Leber			Niere		Milz	Herz
		Parenchymzellen		Gallengangs-	Tubulus-	Glomerula		
		Zytoplasma	Kerne	epithelien	epithelien			
I	Nr.4	+ + + +	+	–	+ +	+	–	–
	5	+ + +	–	–	–	–	–	–
	2	+ + +	+	–	–	–	–	–
	NS	+	–	–	–	–	–	–
II	Nr.4	+	–	–	+ + +	+	–	–
	5	+ + +	+	–	–	–	–	–
	2	+	–	–	–	–	–	–
	NS	–	–	–	–	–	–	–
III	Nr.4	+ + + +	+ +	–	+	+	–	–
	5	+ +	+	–	–	–	–	–
	2	+ + +	–	–	–	–	–	–
	NS	–	–	–	–	–	–	–
IV	Nr.4	+ +	+	–	+ + + +	+ + +	–	–
	5	+	+	–	–	–	–	–
	2	+ +	–	–	–	–	–	–
	NS	–	–	–	–	–	–	–
V	Nr.4	+	+	–	+	–	–	–
	5	+ +	–	–	–	–	–	–
	2	+ +	–	–	–	–	–	–
	NS	–	–	–	–	–	–	–

Tab.: 1 Fluoreszenzserologische Befunde an 5 mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten und anschließend mit homologem Leberantigen sensibilisierten Kaninchen.

Die Anzahl der + entspricht der Fluoreszenzintensität NS = Normal Serum

3. Fluoreszenzserologische Befunde

a) Nur tetrachlorkohlenstoffvergiftete Kaninchen

Bei Inkubierung der Leberschnitte der tetrachlorkohlenstoffvergifteten Tiere mit den fluoreszenzmarkierten Seren wurden keine Fluoreszenz an den Leberparenchymzellen oder Gallengangsepithelien beobachtet. Desgleichen zeigten auch die Kontrolluntersuchungen von Niere, Milz und Herz keine positiven Befunde.

b) Fluoreszenz-Befunde der mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten und mit homologem Leberextrakt und FREUND'schem Adjuvans sensibilisierten Kaninchen.

Bei Inkubierung von Leberschnitten mit homologem markierten Serum fand sich eine zum Teil kräftige Fluoreszenz des Zytoplasmas der Parenchymzellen, während die Fluoreszenz der Parenchymzellkerne nur in einzelnen Präparaten deutlich aufgeprägt war. An den Gallengangsepithelien konnten keine Fluoreszenzerscheinungen festgestellt werden.

Die fluoreszenzserologische Untersuchung der Niere ergab in einigen Fällen eine deutliche Fluoreszenz des Zytoplasmas der Tubulusepithelien, während die Glomerula im wesentlichen keine Fluoreszenz zeigten.

An dem histologischen Präparat der Milz konnte nach Inkubierung mit dem markierten Serum kein eindeutig positiver Befund erhoben werden.

Auch die Herzpräparate zeigten negative Fluoreszenzbefunde.

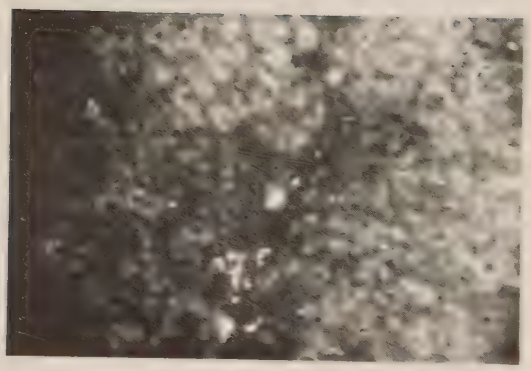

Abb. 1 : 3 Fluoreszenzserologischer Befund eines mit [illegible] markiertem Serum inhibierten Lesezeichens eines Versuchstieres. Man erkennt deutlich die Fluoreszenz des Ectoplasmas der Parenchymzellen, sowie [illegible] des Zellkernes.

Diskussion

[illegible] die für die chronische Hepatitis charakteristisch waren. Zirkulierende Leberantikörper konnten [illegible] sowohl mit der Komplementbindungsreaktion, als auch mit der BOYDENtechnik nicht nachgewiesen werden [illegible]. Die fluoreszenzserologischen Untersuchungen zeigten ebenfalls ein negatives Ergebnis, sodaß also im Verlauf der Tetrachlorkohlenstoffbehandlung bei den Kaninchen keine zirkulierenden Antikörper gegen Lebergewebsantigene auftraten.

Demgegenüber ist bemerkenswert, daß es bei Sensibilisierung von lebergeschädigten Tieren mit homologem Leberextrakt und FREUND'schem Adjuvans zu histopathologisch nachweisbaren Leberveränderungen kam, die denen der chronischen Hepatitis entsprechen. Sie waren grundsätzlich wesentlich intensiver ausgeprägt, als sie bei alleiniger Sensibilisierung mit homologem Lebergewebsextrakt und FREUND'schem Adjuvans ohne vorhergehende Leberschädigung mit Tetrachlorkohlenstoff beobachtet werden. An zirkulierenden Antikörpern waren fluoreszenzserologische antizytoplasmatische Antikörper nachweisbar. Diese waren in erster Linie gegen das Zytoplasma der Leberparenchymzellen gerichtet, zeigten in einzelnen Fällen auch Kreuzreaktionen mit dem Zytoplasma anderer Organe, etwa der Tubulusepithelien der Niere. Daneben wurden mehrmals auch antinukleäre Antikörper gefunden, die nicht organspezifisch waren, sondern in jedem Falle Kreuzreaktionen mit den Zellkernen anderer Organe zeigten.
Die Ergebnisse beweisen, daß Leberveränderungen, die durch eine Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt und FREUND'schem Adjuvans induziert werden, bei einer vorgeschädigten Leber wesentlich ausgeprägter auftreten, als bei einer normalen, intakten Leber.

Die Frage, ob diese Leberveränderungen die gleiche Autonomie zeigen, wie sie für die chronische Hepatitis menschentypisch ist, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht sicher beantwortet werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß es sich hier, wie bei Versuchen mit anderen Tierspezies gezeigt werden konnte (11), zu einer Ausheilung der Leberveränderungen nach Absetzen der Sensibilisierungsmaßnahmen kommt und lediglich bei sehr schweren Leberschädigungen das Bild der postnekrotischen Leberzirrhose zurückbleibt (7). In keinem Falle kommt es jedoch zu einer Zirrhose vom LAEMEC'schen Typ. Somit ist dieser im Tierexperiment produzierte Leberschaden nur bedingt der chronischen Hepatitis des Menschen vergleichbar. Rückschlüsse auf eine gemeinsame Pathogenese im Sinne eines Autoimmunisierungsprozesses lassen sich hieraus nicht ableiten.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde im Tierexperiment (Kaninchen) geprüft, inwieweit die transduodenale Applikation einer lebertoxischen Substanz (Tetrachlorkohlenstoff) zu histologisch faßbaren Leberparenchymschädigungen führt und inwieweit eine zusätzliche Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt derartige Schädigungen vertieft. Im Vergleich hierzu wurden die Ergebnisse früherer experimenteller Studien an der nicht vorgeschädigten Leber zur Diskussion gestellt.

Als Ergebnis ist festzustellen, daß eine Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt an dem durch lebertoxische Substanzen vorgeschädigten Organ wesentlich ausgeprägter auftritt als an dem nicht Vorbehandelten. Dies wurde insbesondere durch fluoreszenzserologische Methoden unter Beweis gestellt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. MINTZLAFF, P.
Immunitätsreaktionen bei Kaninchen nach Sensibilisierung mit arteigenem Leberextrakt.
Dissertationsarbeit Med. Univ.-Klin. Erlg. 1964

2. VORLAENDER,
Über den Nachweis komplementbindender Auto-Antikörper bei Nieren- und Lebererkrankungen.
Z. ges. exp. Med. 118, 352 (1962)

3. KIRSNER, J.B.
Die immunologische Reaktion des Colon.
Z. Gastroenterologie 3, 251 (1965)

4. KIRSNER, J.B., PALMER, W.L.
J. Am. med. Ass. 155, 341 (1954)

5. BEHAR, A.J., TAL, C.
Experimental liver necrosis produced by the injection of homologous whole liver with adjuvant.
J. Path. Bact. 77, 519 (1959)

6. HENNING, N.
Laboratoriumsdiagnostik
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin 1960

7. WALDENSTRÖM, J.
Leber, Blutproteine und Nahrungseiweiß.
15. Tagg. Dtsch. Ges. Verdauungs- u. Stoffwechselkr.
Bad Kissingen 1950

8. HENNING, N., SCHEIFFARTH, F., WARNATZ, H., GROMOTKA, R., NUSSELT, H.
Fluoreszenzserologische Untersuchungen an Biopsiematerial von pathologisch verändertem Lebergewebe.
Z. Gastroenterologie 1, 221 (1963)

9. COHEN, S., OHTA, G., SINGER, E.J., POPPER, H.
Immunocytochemical study of γ-globulin in liver hepatitis and postnecrotic cirrhosis.
J. exp. Med. 111, 185 (1960)

10. PARONETTO, F., SCHAFFNER, F., POPPER, H.
Immunocytochemical reaction of serums of patients with hepatic diseases with hepatic structures.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 106, 216 (1961)

11. PARONETTO, F., SCHAFFNER, F., Mutter, R.D., KNIFFEN, J.C., POPPER, H.
Circulating antibodies in liver disease.
J. Amer. med. Ass. 187, 5o3 (1964)

12. SCHEIFFARTH, F., WARNATZ, H., GÖTZ, H., KETTNER, G.
Tierexperimentelle Studien über die Bildung humoraler Organautoantikörper gegen homo- und autologes Lebergewebe.
Z. Gastroenterologie 2, 279 (1964)

13. CHASE, M.W.
Disseminated granulomata in guinea pigs.
In: H. Ford Hospital Internat. Symposium Mechanisms of hypersensitivity, ed. SHAFFER, J.H., LoGRIPPO, G.A., CHASE, M.W.
p. 673, Little, Brown & Co (1959)

14. STEINER, J.W., LANGER, B., SCHATZ, D.L.
The local and sytemic effects of FREUND's adjuvant and its fractions.
Arch. Path. 70, 424

15. WARNATZ, H., SCHEIFFARTH, F., SCHWARZ, R.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Hepatitis.
II. Mitteilung:
Serologische Studien nach Sensibilisierung mit homologen Leberzellfraktionen.
Virchow's Arch. path. Anat. 339, 364 (1965)

16. GÖTZ, H., SCHEIFFARTH, F., CHRISTMEIER, W.
Weitere tierexperimentelle Studien über die Bildung humoraler Antikörper gegen homo- und autologes Lebergewebe.
Arbeit im Druck

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Frau Dr. H. Götz und Herrn Dr. H. Warnatz, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, meinen Dank auszusprechen.

LEBENSLAUF

Als einziges Kind des Dentisten Ernst Rotsch und seiner Ehefrau Helene Rotsch, geb. Finger, wurde ich am 4. Juli 1937 in Aussig (CSR) geboren. Nach dem Besuch der ersten 2 Volksschulklassen kam ich im Zuge der Austreibung im Jahre 1946 nach Regensburg. Dort trat ich nach der 4. Volksschulklasse in das Neue Gymnasium über, das ich im Jahre 1956 mit dem Reifezeugnis abschloß.

Nach einem Jahr Dienst als Wehrpflichtiger in der Bundeswehr begann ich im Wintersemester 1959 das Studium der Zahnheilkunde an der Universität Erlangen. Im Sommersemester 1962 legte ich hier das Physikum ab und 1965 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.

Zur Zeit bin ich als Pflichtassistent bei Herrn Dr. Wilhelm Hradezky in Dietfurt/Altmühl tätig.

BUCH- UND FOTODRUCK
LUDWIG MÖLLER
ERLANGEN FAHRSTR 5